



Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>

Original Article



## Effects of different levels of Isomaltooligosaccharide on growth, biochemical body composition, and mucosal immunity parameters of juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*)

Seyed Hashem Beitalavi<sup>1</sup>, Hamid Mohammadiazarm<sup>\* 1</sup>, Milad Maniat<sup>2</sup>

1. Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2. Department of Fisheries, Iranian Fisheries organization, Khorramshahr, Khuzestan, Iran

\* Corresponding author Email: azarmhamid@gmail.com

Received: 02 November 2022

Revise Date: 07 November 2022

Accepted: 12 November 2022

DOI: 10.22113/JMST.2022.367844.2499

### ABSTRACT

In this study, in order to use prebiotics as one of the best solutions to maintain the health of farmed aquatic animals and increase their resistance against pathogenic instead of antibiotics, the effects of different levels of isomaltooligosaccharide (ISO) prebiotics on growth performance, biochemical body composition, and mucosal immunity of red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) were investigated. For this purpose, 300 pieces of red tilapia were randomly divided into 15 aquariums with capacity of 100 L in 5 treatments with 3 replications. Experimental treatments as described in the control treatment without ISO, first treatment: the diet containing 2.5 g/kg of ISO, second treatment: the diet containing 5 g/kg of ISO, third treatment: the diet containing 10 g/kg of ISO, and fourth treatment: the diet containing 20 g/kg of ISO. Therefore, the fish were fed ad libitum three times per day for 8 weeks. The result showed that the used prebiotic ISO improves growth and nutritional performance, body biochemical composition, and some biochemical parameters of blood serum in red tilapia. In addition, the mucosal immunity indices of fish were improved under the effect of diets containing prebiotic ISO. Among the experimental treatments, the third treatment had the best performance in terms of final weight (13.4±0.31g), food conversion factor (1.02±0.02), percentage of protein content of body (13.49±0.25), blood serum protein (4.66±0.10 gr/dl), globulin (3.23±0.02 g/dl), and mucus immune indices such as mucus protein (20.29±1.05 mg/ml), immunoglobulin (62.0±0.32 mg/ml), and lysozyme activity (9.14±0.24 u/ml). Therefore, it could be concluded that the use of ISO prebiotics at the level of 1% can have beneficial effects on performance of juveniles red tilapia fish.

**Keywords:** Red tilapia, Prebiotic, Growth, Biochemical body composition, Immunity

### Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## 1. INTRODUCTION

Proper nutrition is considered a key factor in promoting the growth and health of fish. Through appropriate nutrition, not only the physiological needs of fish should be met, but also the conditions for their well-being should be provided (Lee et al., 2015). Over the past decade, antibiotics have commonly been used for managing fish diseases and improving growth and feed conversion ratio (Akrami et al., 2010). However, the widespread distribution and emergence of antibiotic-resistant bacteria have raised concerns about the transfer of these resistant bacteria from aquaculture environments to aquatic ecosystems, potentially harming microbial communities and the immune systems of aquatic organisms (Sapkota et al., 2008). Furthermore, antibiotics can disrupt the growth of beneficial gut bacteria, accumulate in fish bodies, and have adverse effects on fish health (Merrifield and Ringo, 2014).

As a result, the use of antibiotics as growth promoters in aquaculture systems is restricted and prohibited. Therefore, alternative strategies have been considered for nutrition and health management of fish. These strategies include the use of novel dietary supplements such as probiotics, prebiotics, synbiotics, phytochemicals, and other functional feed additives, which contain various compounds aimed at enhancing growth, stimulating immune responses, improving feed efficiency, reducing mortality rates, enhancing digestion, promoting the growth of beneficial gut microbiota, influencing appetite, and increasing nutrient intake (Denev et al., 2009). Additionally, enhancing the mucosal immune system in fish to increase resistance and reduce the risk of diseases through the use of dietary supplements such as immune stimulants, probiotics, prebiotics, and synbiotics has gained considerable attention (Merrifield and Ringo, 2014).

## 2. MATERIALS AND METHODS

In a study, a total of 300 Red Tilapia fish with an initial average weight of  $0.65 \pm 1.1$  grams were obtained from a commercial Tilapia farm in Yazd province, Iran. The fish were randomly distributed among 15 aquariums, with each aquarium having a water volume of 100 liters (20 fish per aquarium or replication). The study included five treatments with three replications each, consisting of four experimental treatments and one control group. A period of acclimation was conducted for the fish to adapt to the new conditions two weeks prior to the start of the experiment. The experimental treatments were as follows:

1. Control Treatment: Basal diet without isomaltooligosaccharide.
2. Treatment 1: Diet containing 2.5 grams of isomaltooligosaccharide per kilogram of feed.
3. Treatment 2: Diet containing 5 grams of isomaltooligosaccharide per kilogram of feed.
4. Treatment 3: Diet containing 10 grams of isomaltooligosaccharide per kilogram of feed.
5. Treatment 4: Diet containing 20 grams of isomaltooligosaccharide per kilogram of feed.

## 3. RESULTS

The evaluation of growth and nutritional indices in the treatments containing prebiotics showed improvement compared to the control treatment ( $p < 0.05$ ). The results of assessing the total protein content of Red Tilapia fish at the end of the experimental period showed a significant increase in the total protein content in the treatments containing prebiotics compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the body fat content in the prebiotic-treated groups significantly decreased compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

DOI: 10.22113/JMST.2022.367844.2499 / در دست انتشار

The protein, globulin, and albumin levels in the prebiotic-treated groups showed an increase compared to the control group, with the highest significant increase observed in Treatment 3 (1% prebiotic) ( $p < 0.05$ ). The evaluation of mucosal immune indices of the fish at the end of the experimental period showed a significant increase in the total protein and immunoglobulin levels in the mucous of the prebiotic-treated groups compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSION AND CONCLUSION

The results of this experiment demonstrate that the use of different levels of isomaltooligosaccharide prebiotic leads to an improvement in growth and nutritional performance in Red Tilapia fish. Among the treatments, fish fed with 1% or 10 grams of prebiotic per kilogram of feed exhibited the best performance.

In terms of the beneficial effects of the used prebiotic, it can be stated that oligosaccharides, due to their specific structure and the absence of hydrolytic enzymes in fish for breaking down  $\beta$ -type linkages between monosaccharide units, are resistant to digestion and can only be metabolized by certain anaerobic bacteria present in the digestive system (Merrifield and Ringo, 2014). Therefore, the predominant bacteria involved are lactobacilli, bifidobacteria, and many lactic acid bacteria, which can utilize oligosaccharides through fermentation and thereby have beneficial effects on the host. Additionally, due to the reduction in intestinal pH caused by the fermentative conditions and acid production by the beneficial bacterial population, it can inhibit the activity of harmful and pathogenic bacteria in the digestive system. Moreover, it can enhance mineral absorption (Merrifield and Ringo, 2014). In conclusion, based on the obtained results, it can be stated that the use of diets containing isomaltooligosaccharide prebiotic has improved growth, nutrition, carcass composition, blood biochemistry, and mucosal immunity indices in Red Tilapia fish.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The officials of Khorramshahr University of Marine Science and Technology are sincerely thanked and appreciated for their support in conducting this research as part of a Master's thesis.

#### REFERENCES

- Lee, C.S., Lim, C., Gatlin, D.M. and Webster, C.D. 2015. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health. Wiley-Blackwell.
- Akrami, R., Ghelichi, A. and Gharaei, A. 2010. The use of prebiotics in aquaculture. 2010. *Journal of Fisheries*, 4(1), pp111. (In Persian)
- Merrifield, D.L. and Ringo, E. 2014. Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics, and Prebiotics. Wiley Blackwell.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. and Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Journal International Aquatic Research*, 1(1), pp. 129.



مقاله پژوهشی

Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>



## اثرات سطوح مختلف پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، ترکیب بیوشیمیایی بدن و ایمنی موکوس ماهی جوان تیلاپای قرمز (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*)

سید هاشم بیت علوی<sup>۱</sup>، حمید محمدی آذرم<sup>۱\*</sup>، میلاد منیعات<sup>۲</sup>

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۲. اداره شیلات خرمشهر، اداره کل شیلات خوزستان، خرمشهر، ایران.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [azarmhamid@gmail.com](mailto:azarmhamid@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۱

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2022.367844.2499

### چکیده

در این مطالعه به جهت استفاده از پری بیوتیک‌ها به عنوان یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آنها در برابر عوامل بیماریزا به جای آنتی بیوتیک‌ها، اثرات سطوح مختلف پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، ترکیب بیوشیمیایی بدن و ایمنی ماهی جوان تیلاپای قرمز (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی تیلاپای قرمز در ۱۵ آکوریوم با حجم آگیری ۱۰۰ لیتر در ۵ تیمار با ۳ تکرار به صورت تصادفی تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی به شرح تیمار شاهد: جیره غذایی پایه بدون ایزومالتوالیگوساکارید، تیمار اول: جیره غذایی حاوی ۲/۵ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا، تیمار دوم: جیره غذایی حاوی ۵ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا، تیمار سوم: جیره غذایی حاوی ۱۰ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا، تیمار چهارم: جیره غذایی حاوی ۲۰ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم بودند. لذا ماهیان سه بار در روز در حد سیری به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. نتایج نشان داد که پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید استفاده شده منجر به بهبود عملکرد رشد و تغذیه‌ای، ترکیبات بیوشیمیایی بدن و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی تیلاپای قرمز شده است. همچنین شاخص‌های ایمنی موکوس ماهیان نیز تحت تاثیر استفاده از جیره‌های غذایی حاوی پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بهبود پیدا کردند. تیمار سوم در بین تیمارهای آزمایشی بهترین عملکرد را از نظر مقدار وزن نهایی (۱۳/۴±۰/۳۱ گرم)، ضریب تبدیل غذایی (۱/۰۲±۰/۰۲)، درصد پروتئین بدن (۱۳/۴۹±۰/۲۵)، پروتئین سرم خون (۴/۶۶±۰/۱۰ گرم در دسی لیتر)، گلوبولین (۳/۲۳±۰/۰۲ گرم در دسی لیتر) و شاخص‌های ایمنی موکوس مانند پروتئین موکوس (۲۰/۲۹±۱/۰۵ میلی گرم در میلی لیتر)، ایمونوگلوبولین (۷/۶۲±۰/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت لیزوزیم (۹/۱۴±۰/۲۴ واحد در میلی لیتر) نشان داد. لذا می توان نتیجه گیری نمود استفاده از پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید در سطح ۱ درصد اثرات مطلوبی بر عملکرد ماهیان جوان تیلاپای قرمز دارد.

**واژگان کلیدی:** تیلاپای قرمز، پری بیوتیک، رشد، ترکیب بیوشیمیایی بدن، ایمنی

### Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## ۱. مقدمه

باکتری های روده منجر به بهبود سلامت میزبان می شوند (Gibson and Roberfroid, 1995). پری بیوتیک با تغییر فلور دستگاه گوارش و مهار رشد گونه های بیماری زا یا رشد باکتری های مفید دستگاه گوارش اثر خود را اعمال می کند (Merrifield and Ringo, 2014). این مواد به عنوان کربوهیدرات ها پیچیده جیره که غیر قابل هضم هستند تعریف می شوند، زیرا باندهای بتا بین مونومرهای فروکتوز نمی توانند توسط آنزیم های داخلی بدن حیوان هیدرولیز شوند در نتیجه به عنوان سوبسترا در دسترس میکروارگانیسم های دستگاه گوارش قرار می گیرند (Merrifield and Ringo, 2014) از طرفی پری بیوتیک ها به صورت انتخابی باعث تحریک فعالیت و متابولیسم باکتری های مفید موجود در انتهای دستگاه گوارش شده و از این طریق باعث تعادل باکتریایی در میزبان می شوند (Lee et al., 2015). یکی از انواع الیگوساکاریدها که اخیراً به عنوان پری بیوتیک در تغذیه آبزیان مطرح شده ایزوماتوالیگوساکارید است.

با وجود اثرات مفیدی که برای پری بیوتیک در نظر گرفته شده است، تحقیقات در این زمینه هنوز در ابتدای راه قرار داشته و تحقیقات محدودی انجام شده است. برای مثال در مطالعه ای در خصوص اثر ۰/۴ درصد بتاگلوکاکان و ۰/۴ درصد مانان الیگوساکارید در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، فاکتورهای رشد و ایمنی ماهیان بهبود یافت (Jami et al., 2019). استفاده از ۰/۵ تا ۱/۵ گرم بتاگلوکاکان و مانان الیگوساکارید در جیره غذایی ماهی تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) منجر به افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری زای محیطی شد (Ismail et al., 2019). همچنین در مطالعه ای بر ماهی شانک سفید (*Diplodus sargus*) اثر سطوح مختلف فروکتوالیگوساکارید، گالاتوالیگوساکارید و زیلوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، زنده ماندن، ایمنی، فعالیت آنزیم های گوارشی و مرفولوژی روده ماهیان انجام گرفت. لذا نتایج نشان دهنده اثر گذاری مطلوب یک درصد فروکتوالیگوساکارید، زیلوالیگوساکارید و یا گالاتوالیگوساکارید بر پارامترهای بیان شده در ماهیان بود (Guerreiro et al., 2018). استفاده از یک درصد فروکاوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهیان استرلیاد (*Acipenser stellatus*) منجر به افزایش فعالیت لیروزیم سرم در ماهیان شد (Akrami et al., 2013). همچنین استفاده از یک درصد گالاتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهیان شوریده قرمز (*Sciaenops ocellatus*) منجر به افزایش سطوح پارامترهای ایمنی مانند فعالیت لیروزیم و انفجار تنفسی و همچنین طول پرزهای روده ماهیان شد (Zhou et al., 2010). از طرفی بررسی اثرات استفاده از سطوح مختلف مانان الیگوساکارید در جیره غذایی سی بریم اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) نشان دهنده اثرات مثبت سطح ۰/۴ درصد پری بیوتیک به کار رفته در جیره غذایی ماهیان بود (Torrecillas et al., 2016).

تغذیه مناسب به عنوان یکی از عوامل کلیدی در ارتقای رشد و سلامت ماهی می باشد. به واسطه غذای مناسب همواره باید علاوه بر تأمین نیازهای فیزیولوژیک ماهی، موجبات سلامت ماهیان را تأمین نمود (Lee et al., 2015). در طی ده سال گذشته آنتی بیوتیک ها بطور مرسوم برای مدیریت بیماری های آبزیان و همچنین برای افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذای مورد استفاده قرار می گرفتند (Akrami et al., 2010). با توجه به اینکه پخش و گسترش باکتری های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک ها به اثبات رسیده است، این خطر وجود دارد که باکتری های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک ها از محیط آبی پروری به محیط های آبی وارد شوند و در نتیجه منجر به صدمه به جوامع میکروبی و سیستم ایمنی ماهیان موجود در محیط های آبی شوند (Sapkota et al., 2008). همچنین آنتی بیوتیک ها منجر به متوقف کردن رشد یا کشتن باکتری های مفید روده ای شده و از سوی دیگر در بدن آبزی تجمع می کنند (Merrifield and Ringo, 2014).

بر همین اساس استفاده از آنتی بیوتیک ها بعنوان محرک رشد در سیستم های تولید آبزیان با محدودیت و ممنوعیت همراه می باشد. لذا در ارتباط با ممنوعیت استفاده از محرک های رشد آنتی بیوتیکی برنامه های جدیدی برای مدیریت تغذیه و سلامتی آبزی در نظر گرفته شده است. مانند بکارگیری مکمل های غذایی جدید نظیر پروبیوتیک ها، پری بیوتیک ها، سین بیوتیک ها، فیتوبیوتیک ها و سایر مکمل های غذایی کاربردی که حاوی ترکیبات مختلف برای افزایش رشد، تحریک و بلوغ سریع سیستم ایمنی، بهبود کارایی غذا، کاهش میزان مرگ و میر، بهبود فرآیند هضم، رشد سریع میکرو فلورهای مناسب روده، تاثیر بر میزان اشتها و افزایش میزان تغذیه است (Denev et al., 2009). همچنین ارتقاء سیستم ایمنی موکوسی در ماهی به جهت افزایش مقاومت و کاهش امکان ابتلا به بیماری با استفاده از مکمل های غذایی از جمله محرک های ایمنی، پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک یکی از راهکارهایی است که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Merrifield and Ringo, 2014). موکوس به عنوان جزئی از مکانیسم ذاتی، با ریختن پوست و بافت های مرده و تولید مستمر آن، همیشه وجود داشته و از اتصال پاتوژن ها و عوامل بیگانه نیز جلوگیری می کند. همچنین موکوس منبع مهمی از اجزاء مهم در سیستم ایمنی غیراختصاصی شامل لیروزیم، ایمونوگلوبین ها، پروتئین های کمپلمان، لکتین ها، آنزیم های پروتئولیتیک، پروتئین واکنش دهنده C و دیگر پروتئین ها و لیپیدهای آنتی باکتریال می باشد (Subramanian et al., 2007).

پری بیوتیک ها مواد غذایی غیر قابل هضمی هستند که به عنوان محرک رشد شناخته شده و همچنین با محدود کردن تمام یا تعدادی از

لحاظ تولید این ماهی ضروری است. لذا در این مطالعه به بررسی اثرات سطوح مختلف پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و ایمنی موکوس ماهی تیلاپای قرمز پرداخته می شود.

## ۲. مواد و روش ها

تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی تیلاپای قرمز با میانگین وزن اولیه ۰/۰۴ ± ۶۵/۱ گرم از یکی مزارع پرورش تجاری تیلاپا در استان یزد تامین شد و به طور کاملاً تصادفی بین ۱۵ عدد آکواریوم با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر توزیع شد (۲۰ قطعه ماهی به ازای هر آکواریوم یا تکرار). در این مطالعه پنج تیمار با سه تکرار در نظر گرفته شد. چهار تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد بود. قبل از ذخیره سازی، آکواریوم ها کاملاً با بتادین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) ضد عفونی و با آب شستشو داده شدند و سپس آبگیری آنها با آب شهری کلرزدایی شده با هوادهی صورت گرفت. دوره سازگاری ماهیان جهت سازگار شدن با شرایط جدید، به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش انجام شد. در طول دوره سازگاری، روزانه ۳ بار غذاهای تا حد سیری با غذای فرموله شده پایه (شاهد) انجام گرفت (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی به شرح تیمار شاهد: جیره غذایی پایه بدون ایزومالتوالیگوساکارید، تیمار اول: جیره غذایی حاوی ۲/۵ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا، تیمار دوم: جیره غذایی حاوی ۵ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا، تیمار سوم: جیره غذایی حاوی ۱۰ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا، تیمار چهارم: جیره غذایی حاوی ۲۰ گرم ایزومالتوالیگوساکارید در هر کیلوگرم غذا بودند.

### جدول ۱- ترکیب جیره های آزمایشی مورد استفاده (درصد وزن خشک)

Table 1- Composition of experimental diets (percent of dry matter)

تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	اقلام غذایی
۱۷/۶۲	۱۷/۶۲	۱۷/۶۲	۱۷/۶۲	۱۷/۶۲	آرد ماهی
۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	پودر سویا
۳۰/۷۸	۳۰/۷۸	۳۰/۷۸	۳۰/۷۸	۳۰/۷۸	آرد گندم
۵	۵	۵	۵	۵	گلوتن ذرت
۵/۶۰	۵/۶۰	۵/۶۰	۵/۶۰	۵/۶۰	روغن ماهی
۲	۲	۲	۲	۲	مکمل ویتامینه
۱	۱	۱	۱	۱	مکمل معدنی
۱	۱	۱	۱	۱	ژلاتین
۰	۱	۱/۵	۱/۷۵	۲	پرکننده (سلولز)
۲	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰	پری بیوتیک

ترکیب بیوشیمیایی جیره پایه (بر مبنای وزن خشک): ماده خشک: ۹۰/۳۱٪، پروتئین: ۳۵٪، چربی: ۸٪، انرژی: ۳/۵ کیلوکالری در هر گرم

Biochemical composition of basal diet (based on dry weight): dry matter: 90.31%, protein: 35%, fat: 8%, energy: 3.5 kcal per gram

در خصوص پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید تحقیقات بسیار نادر است. با این حال بررسی های یک مطالعه نشان داد استفاده از ایزومالتوالیگوساکارید در جیره غذایی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) باعث افزایش زندهمانی و مقاومت به استرس شوری می شود (Haghipoor et al., 2015). همچنین استفاده از پروبیوتیک با سیلوس و ایزومالتوالیگوساکارید باعث افزایش بازماندگی و ارتقای سطح سیستم ایمنی در میگوی ببری ژاپنی شد (Zhang et al., 2010).

امروزه تیلاپا به یکی از رایج ترین ماهیان موجود در سیستم های پرورشی در جهان تبدیل شده و پس از ماهی کپور بالاترین میزان تولید را به خود اختصاص داده است (ElSayed, 2019). در این میان پرورش ماهی تیلاپای قرمز که هیبرید بین گونه تیلاپای نیل و موزامبیک (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) می باشد، در کشورهای آسیایی مانند چین، تایوان، تایلند، اندونزی و فیلیپین بسیار رواج دارد. از علل مهم تمایل به پرورش ماهی تیلاپای قرمز رشد بسیار مناسب و رنگ پذیری جذاب و مشتری پسندی بالای این ماهی می باشد (ElSayed, 2019). لازم به ذکر است در حال حاضر در کشور ایران در چهار استان سمنان، یزد، خراسان جنوبی و قم پرورش تیلاپای قرمز در بالامانع اعلام شده است. دوره رشد سریع و تراکم پذیری بالا، ضریب تبدیل مناسب و تکثیر آسان، بازارپسندی مناسب، فیله پذیری، ارزش غذایی مطلوب و امکان پرورش در آب های لب شور و غیرمعتاد از دیگر مزیت های تولید ماهی تیلاپا در این استانها می باشد که می تواند نقش مؤثری در امنیت غذایی کشور داشته باشد. در نتیجه دسترس به جیره مناسب تغذیه ای مناسب به

بندی و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری گردید. در طول مدت آزمایش که به مدت ۸ هفته ادامه یافت، ماهیان ۳ بار در روز در ساعات ۸، ۱۲ و ۱۸ در حد سیری تغذیه شدند. به منظور توزیع یکنواخت غذا، کاهش تلاطم آب و افزایش زمان ماندگاری غذا در آب، در طول مدت غذایی، هوادهی در تانک‌ها قطع گردیده و پس از ۳۰ دقیقه، مجدداً هوادهی انجام گرفت.

در انتهای دوره و پس از بیهوشی کامل با عصاره گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر یک لیتر آب)، تمام ماهیان هر تکرار وزن شدند. در ادامه شاخص‌های افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و میزان بازماندگی، بر اساس روابط ۱ تا ۴ محاسبه شدند.

وزن اولیه - وزن نهایی = افزایش وزن بدن (WG: Weight gain)

۱۰۰ × دوره پرورش به روز (Ln W<sub>2</sub> Ln W<sub>1</sub>) = درصد ضریب رشد ویژه (SGR: Specific growth rate)

افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی (FCR: Food conversion ratio)

۱۰۰ × تعداد ماهیان / تعداد ماهیان باقی مانده = درصد بازماندگی (SR: Survival rate)

سرنگ‌های غیر هیپارینه انجام گردید. در ادامه سرم مورد آزمایش تا زمان سنجش در فریزر ۸۰ نگهداری شد. پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون در این مطالعه شامل گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین، آلبومین به وسیله دستگاه اتوآنالایزر (Mindrey BS200، چین) با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) و روش فوتومتریک مورد سنجش قرار گرفت. همچنین قبل از اندازه‌گیری فاکتورهای مورد نظر به منظور بالابردن دقت و صحت نتایج، دستگاه اتوآنالایزر به وسیله سرم کالیبراتور TruCal U و سپس با استفاده از سرم کنترل‌های TruLab P و TruLab N ساخت شرکت پارس آزمون قبل از انجام آزمایش و در طول انجام آزمایش کنترل گردید. برای به دست آوردن میزان گلوبولین نیز، مقادیر آلبومین از پروتئین کسر گردید.

جهت جمع‌آوری موکوس ماهیان ۳ عدد ماهی از هر تکرار (۹ قطعه ماهی از هر تیمار) پس از بیهوشی با عصاره گل میخک به صورت جداگانه درون کیسه‌های پلاستیکی حاوی ۲ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. سپس به مدت ۲ دقیقه ماهی‌ها در کیسه‌های مورد نظر تکان داده شدند و بعد از آن ماهی‌ها از کیسه خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰g در دمای ۴

لذا به جهت آماده‌سازی جیره‌های غذایی پس از تعیین میزان مورد نیاز هر کدام از اقلام جیره‌های غذایی در برنامه جیره نویسی WUFFDA مطابق با نیاز غذایی (Jobling, 2012)، ابتدا اقلام غذای خشک جیره‌ی پایه آسیاب گردیده و از الک عبور داده شدند. سپس با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و به مدت ۳۰ دقیقه به صورت یکنواخت به هم زده شدند. سپس مقادیر مشخص روغن نیز به مخلوط اضافه گردید و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. در ادامه مقادیر مورد نیاز پری‌بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید تهیه شده (BNEO GmbH, Mannheim, Germany) به همراه محلول آب و پودر ژلاتین به مخلوط اضافه شده و خمیر حاصله به وسیله دستگاه چرخ گوشت برقی به صورت رشته‌های غذایی در سینی‌های جداگانه قرار گرفتند. در نهایت جیره‌های غذایی تهیه شده در دمای معمولی آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت خشک و در کیسه‌های پلاستیکی بسته

رابطه (۱)

رابطه (۲)

رابطه (۳)

رابطه (۴)

همچنین در پایان دوره‌ی آزمایش جهت ارزیابی ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهیان، تعداد ۵ قطعه ماهی از هر تکرار (۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار) به طور تصادفی از تانک‌ها خارج و تا زمان انجام آنالیزها در فریزر، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنالیز تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی لاشه با استفاده از روش‌های استاندارد (AOAC, 1995) انجام شد. لذا مقدار رطوبت درون نمونه‌ها با استفاده از اون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت مورد سنجش قرار گرفت. میزان پروتئین بدن ماهیان براساس روش کج‌دال و با استفاده از دستگاه کج‌دال اتوماتیک (مدل TM2300، شرکت Foss، سوئد) تعیین گردید. همچنین میزان چربی نمونه‌های ماهی، با استفاده از دستگاه سوکسله (مدل TM8000، شرکت Foss، سوئد) مورد سنجش قرار گرفت. در ادامه به منظور سنجش مقدار خاکستر، نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت در یک کوره الکتریکی با دمای تقریبی ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شدند.

در پایان دوره آزمایش، به منظور ارزیابی فاکتورهای خونی تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار (۹ قطعه ماهی از هر تیمار) به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شده و به وسیله عصاره گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شدند. خون گیری از طریق ساقه دمی و با استفاده از

های رشد و تغذیه‌ای در تیمارهای حاوی پری بیوتیک نشان دهنده بهبود نسبت به تیمار شاهد بود ( $P < 0.05$ ). در این بین وزن نهایی ماهیان تیلاپیای قرمز در تیمار ۳ (یک درصد پری بیوتیک) نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ). به طوری که با افزایش معنی دار میزان وزن نهایی در این تیمار، میزان افزایش وزن بدن (گرم) و میزان ضریب رشد ویژه، افزایش معنی داری نشان داد ( $P < 0.05$ ). میزان ضریب تبدیل غذایی نیز به صورت معنی داری در تیمار ۳ نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی به جز تیمار ۲ کاهش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). اما میزان بازماندگی در پایان دوره آزمایشی هیچ اختلاف معنی داری در بین گروه‌های آزمایشی نداشت ( $P > 0.05$ ).

نتایج ارزیابی شاخص‌های ترکیبات بیوشیمیایی بدن ماهیان تیلاپیای قرمز در انتهای دوره آزمایشی در جدول ۳ آمده است. نتایج ارزیابی میزان پروتئین کل ماهیان تیلاپیای قرمز در انتهای دوره آزمایشی نشان داد، میزان پروتئین کل در تیمارهای حاوی پری بیوتیک به صورت معنی داری نسبت به سایر گروه‌ها شاهد افزایش داشتند ( $P < 0.05$ ). میزان چربی بدن در تیمارهای حاوی پری بیوتیک به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). کمترین درصد چربی لاشه ( $6/02 \pm 0/08$ ) و بیشترین درصد پروتئین لاشه ( $13/49 \pm 0/25$ ) در تیمار ۳ (یک درصد پری بیوتیک) مشاهده شد. همچنین میزان رطوبت و خاکستر تفاوت معنی داری در بین گروه‌های آزمایشی نداشت ( $P > 0.05$ ).

درجه سانتی گراد سانتیفریوز شد. سپس مایع رویی به میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری منتقل و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Safari et al., 2017). اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل موکوس با استفاده از کیت آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) و روش لوری در طول موج ۷۴۰ به وسیله دستگاه اتوآنالایزر (Mindrey BS200، چین) انجام شد. اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل بر اساس اندازه‌گیری میزان پروتئین کل مخاط ماهی‌ها قبل و بعد از رسوب مولکول‌های ایمونوگلوبولین و با استفاده از محلول پلی اتیلن گلیکول ۱۲٪ انجام شد (Siwicki, 1993). همچنین فعالیت لیزوزیم بر اساس رسوب و نابودی باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* که به لیزوزیم حساس است به روش کدورت سنجی و در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Ellis, 1990).

در مال بودن داده‌ها به وسیله آزمون Shapiro Wilk مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های رشد و ایمنی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (oneway ANOVA) و تست Duncan به عنوان پس آزمون، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SE) بیان شده است.

### ۳. نتایج

نتایج ارزیابی شاخص‌های رشد و تغذیه‌ای ماهیان تیلاپیای قرمز در انتهای دوره آزمایشی در جدول ۲ آمده است. نتایج ارزیابی شاخص

جدول ۲- شاخص‌های رشد و تغذیه ماهیان تیلاپیای قرمز در انتهای دوره آزمایشی

Table 2- Growth and feeding parameters of Red tilapia fish at the end of experiment.

شاخص	تیمارهای آزمایشی				
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
وزن اولیه (گرم)	۱/۶۷±۰/۰۴	۱/۶۶±۰/۰۳	۱/۶۳±۰/۰۴	۱/۶۶±۰/۰۵	۱/۶۶±۰/۰۳
وزن نهایی (گرم)	۸/۱۸±۰/۲۲ <sup>a</sup>	۹/۵۱±۰/۴۳ <sup>b</sup>	۱۲/۰۳±۰/۹۸ <sup>c</sup>	۱۳/۴۰±۰/۳۱ <sup>d</sup>	۹/۴۱±۰/۲۹ <sup>b</sup>
افزایش وزن بدن (گرم)	۶/۵۰±۰/۱۷ <sup>a</sup>	۷/۸۳±۰/۴۰ <sup>b</sup>	۱۰/۴۰±۰/۹۶ <sup>c</sup>	۱۱/۷۳±۰/۲۵ <sup>d</sup>	۷/۷۳±۰/۲۶ <sup>b</sup>
ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	۲/۸۳±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۳/۱۲±۰/۰۴ <sup>b</sup>	۳/۵۶±۰/۰۹ <sup>c</sup>	۳/۷۲±۰/۱۷ <sup>d</sup>	۳/۱۰±۰/۰۲ <sup>b</sup>
ضریب تبدیل غذایی	۱/۶۰±۰/۱۰ <sup>c</sup>	۱/۲۷±۰/۰۶ <sup>b</sup>	۱/۱۱±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۱/۰۲±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱/۳۴±۰/۰۶ <sup>b</sup>
بازماندگی (درصد)	۹۶/۶۶±۲/۸۸	۱۰۰	۹۸/۳۳±۲/۸۸	۹۸/۳۳±۲/۸۸	۹۶/۶۶±۲/۸۸

\* حروف متفاوت نشانه در هر ردیف وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است (داده  $\pm$  خطای استاندارد،  $P < 0.05$ ).

A different lowercase in the same row denotes statistically significant differences (Mean  $\pm$  S.E,  $P < 0.05$ ).

موکوس در تیمارهای حاوی پری بیوتیک به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافتند ( $P < 0.05$ ). از طرفی مقدار پروتئین کل در تیمار ۳ (یک درصد پری بیوتیک) به صورت معنی داری نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی افزایش داشت ( $P < 0.05$ ). همچنین بیشترین میزان ایمونوگلوبولین کل موکوس در انتهای دوره آزمایشی مربوط به تیمار ۳ (یک درصد پری بیوتیک) بود، که اختلاف معنی داری با سایر گروه‌های آزمایشی داشت ( $P < 0.05$ ). از طرفی فعالیت لیزوزیم موکوس ماهیان تیلاپیای قرمز در تیمار ۳ به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی افزایش داشت ( $P < 0.05$ ).

نتایج حاصل از ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون ماهیان در جدول ۴ آمده است. مقدار پروتئین، گلوبولین و آلبومین در تیمارهای حاوی پری بیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش داشت که در تیمار ۳ (یک درصد پری بیوتیک) این افزایش معنی دار، بیشترین مقدار بوده است ( $P < 0.05$ ). نتایج ارزیابی گلوکز حاکی از کاهش معنی دار میزان گلوکز در تیمار ۳ نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی بود ( $P < 0.05$ ). همچنین مقدار کلسترول و تری گلیسرید در تیمار ۳ (یک درصد پری بیوتیک) به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا نمود ( $P < 0.05$ ).

نتایج ارزیابی شاخص‌های ایمنی موکوس ماهیان در انتهای دوره آزمایشی نشان داد که مقدار پروتئین کل و ایمونوگلوبولین

جدول ۳- آنالیز تقریبی ماهیان تیلاپیای قرمز در انتهای دوره آزمایش (درصد وزن تر)

Table 3- The proximate composition of Red tilapia fish at the end of experiment (wet weight)

شاخص	تیمارهای آزمایشی			
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
رطوبت	77/19 ± 3/10	76/07 ± 4/09	76/74 ± 5/11	75/63 ± 1/47
پروتئین	11/22 ± 0/60 <sup>a</sup>	12/38 ± 0/36 <sup>b</sup>	12/98 ± 0/27 <sup>c</sup>	13/49 ± 0/25 <sup>d</sup>
چربی	6/46 ± 0/19 <sup>b</sup>	6/42 ± 0/20 <sup>b</sup>	6/21 ± 0/15 <sup>ab</sup>	6/02 ± 0/08 <sup>a</sup>
خاکستر	3/77 ± 0/12	3/68 ± 0/20	3/52 ± 0/15	3/54 ± 0/13

\* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است (داده ± خطای استاندارد،  $P < 0.05$ ).

A different lowercase in the same row denotes statistically significant differences (Mean ± S.E,  $P < 0.05$ ).

جدول ۴- فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و ایمنی موکوس ماهیان تیلاپیای قرمز در انتهای دوره آزمایش

Table 4 - Serum biochemical and mucosal immunity indices of Red tilapia fish at the end of experiment

شاخص بیوشیمیایی خون	تیمارهای آزمایشی			
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
پروتئین (گرم بر دسی لیتر)	4/10 ± 0/12 <sup>a</sup>	4/34 ± 0/24 <sup>abc</sup>	4/56 ± 0/17 <sup>bc</sup>	4/66 ± 0/10 <sup>c</sup>
آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	1/14 ± 0/07 <sup>a</sup>	1/23 ± 0/09 <sup>abc</sup>	1/36 ± 0/10 <sup>bc</sup>	1/42 ± 0/10 <sup>c</sup>
گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	2/96 ± 0/05 <sup>a</sup>	3/11 ± 0/14 <sup>ab</sup>	3/19 ± 0/07 <sup>b</sup>	3/23 ± 0/02 <sup>b</sup>
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)	75/14 ± 1/03 <sup>a</sup>	74/19 ± 1/02 <sup>a</sup>	70/15 ± 1/35 <sup>a</sup>	67/28 ± 0/96 <sup>b</sup>
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)	122/33 ± 3/78 <sup>b</sup>	114/63 ± 4/04 <sup>ab</sup>	111/33 ± 8/14 <sup>ab</sup>	103/55 ± 4/71 <sup>a</sup>
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	225/33 ± 16/62 <sup>c</sup>	218/13 ± 11/00 <sup>c</sup>	200/63 ± 6/50 <sup>b</sup>	186/23 ± 12/15 <sup>a</sup>
پروتئین کل موکوس (میلی گرم بر میلی لیتر)	11/42 ± 0/29 <sup>a</sup>	14/78 ± 0/55 <sup>b</sup>	17/90 ± 0/69 <sup>c</sup>	20/29 ± 1/05 <sup>d</sup>
ایمونوگلوبولین موکوس (میلی گرم بر میلی لیتر)	4/17 ± 0/11 <sup>a</sup>	5/70 ± 0/41 <sup>b</sup>	6/44 ± 0/33 <sup>c</sup>	7/62 ± 0/37 <sup>d</sup>
لیزوزیم موکوس (واحد در میلی لیتر)	8/25 ± 0/16 <sup>a</sup>	8/40 ± 0/18 <sup>ab</sup>	8/62 ± 0/12 <sup>b</sup>	9/14 ± 0/24 <sup>c</sup>

\* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است (داده ± خطای استاندارد،  $P < 0.05$ ).

A different lowercase in the same row denotes statistically significant differences (Mean ± S.E,  $P < 0.05$ ).

## ۴. بحث

دریای خزر دارای پتانسیل موثری در مصرف چربی برای تولید انرژی مورد نیاز بدن و در نتیجه صرفه‌جویی در مصرف پروتئین و تبدیل حداکثر غذای مصرفی به پروتئین بافت بدن بوده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین لازم به ذکر است در برخی آزمایشات عدم تاثیر گذاری استفاده از پری بیوتیک در ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهیان گزارش شده است (Akrami et al., 2010). که علت اختلاف در نتایج را می‌توان به نوع، اندازه و سن گونه پرورشی و همچنین طول دوره پرورشی، شرایط محیطی و بهداشتی، رفتارشناسی تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک موجود، نوع مواد تشکیل دهنده جیره غذایی و کمیت و کیفیت آن‌ها، ترکیب جیره غذایی، نوع پری بیوتیک مورد استفاده، میزان درجه خلوص و سطح مورد استفاده آن در جیره غذایی، نحوه افزودن پری بیوتیک به جیره غذایی و حتی فلور میکروبی روده ماهی که قادر به استفاده از آن به عنوان سوبسترا هستند، نسبت داد (Sabrin Joibari et al., 2017).

بررسی اثر سطوح مختلف ایزومالتوالیگوساکارید بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون نشان داد، تا سطح ۱۰ گرم بر کیلوگرم منجر به ایجاد روند افزایشی در مقدار پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم خون در ماهیان مورد آزمایش می‌شود. در این خصوص Lotfan et al. (2009) بیان کرده‌اند که افزایش پروتئین سرم می‌تواند نشان دهنده افزایش متابولیسم، قابلیت هضم و جذب پروتئین در اندام‌های جاندار تغذیه شده با جیره‌های حاوی پری بیوتیک باشد. همچنین بیان کردند پری بیوتیکها با افزایش باکتریهای مفید روده، موجب تشدید متابولیسم پروتئین و افزایش جذب آن در اندام‌های موجود و با تحریک جذب و ذخیره مواد معدنی به خصوص کلسیم و فسفر، روی متابولیت‌های خون از جمله آلبومین اثر می‌گذارند. همچنین Mokhtari et al. (2016) بیان داشتند که سطح بالای پروتئین و گلوبولین خون نشان دهنده ی بالا بودن ایمنی در آبزی می‌باشد. لذا افزایش سطح گلوبولین می‌تواند ناشی از تحریک لکوسیت‌ها به ویژه لنفوسیت‌ها و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها باشد که بیشترین میزان گلوبولین‌های خون را به خود اختصاص می‌دهند.

از طرفی در مطالعه حاضر مشاهده شد که سطوح مختلف پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید تا سطح ۱۰ گرم در کیلوگرم غذا به طور معنی داری منجر به ایجاد روند کاهش در مقدار تری گلیسرید، کلسترول و گلوکز در مقایسه با شاهد شده است. در تطابق با نتایج این آزمایش، نتایج سایر تحقیقات نشان می‌دهد که اضافه کردن پری بیوتیک‌ها به جیره جانداران منجر به کاهش کلسترول و تری گلیسرید می‌شود (Gargari et al., 2013). در خصوص کاهش کلسترول توسط پری بیوتیکها، مکانیسم‌های متفاوتی پیشنهاد شده است. برای مثال بیان شده است که اثرات مفید پری بیوتیکها بر روی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از سطوح مختلف پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید منجر به بهبود عملکرد رشد و تغذیه‌ای در ماهیان تیلاپمای قرمز می‌گردد، که در این بین ماهیان تغذیه شده با مقدار یک درصد یا ۱۰ گرم پری بیوتیک به ازای کیلوگرم غذا بهترین عملکرد را نشان دادند. در این ارتباط Ibrahim et al. (2013) بیان کردند استفاده از پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید در جیره غذایی تیلاپیا نیل منجر به افزایش معنی دار رشد و مصرف خوراک شده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین سایر مطالعات همانند Jami et al. (2019) بر ماهی آزاد در یای خزر، Ismail et al. (2019) بر تیلاپمای نیل، Guerreiro et al. (2018) بر شانک سفید، Akrami et al. (2013) بر ماهی استرلیاد، Zhou et al. (2010) بر ماهی شوریده قرمز نشان دهنده اثرات بهینه بکارگیری پری بیوتیکها در جیره غذایی ماهیان بر رشد، زنده مانی و ایمنی ماهیان بوده است.

در خصوص اثر گذاری مطلوب پری بیوتیک مورد استفاده می‌توان بیان کرد که الیگوساکاریدها به دلیل ساختار خاص و عدم برخورداری ماهیان از آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی اتصالات نوع  $\beta$  بین واحدهای منوساکاریدی، در برابر فرآیند گوارش مقاومت کرده و صرفاً توسط برخی از باکتری‌های بی‌هوازی موجود در دستگاه گوارش قابلیت تجزیه شدن را دارند (Merrifield and Ringo, 2014). لذا عمدتاً باکتری‌ها شامل لاکتوباسیلوس‌ها، بیفیدوباکترها و بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که می‌توانند با استفاده از تخمیر الیگوساکاریدها تغذیه کرده و به این وسیله اثرات مفیدی روی میزبان داشته باشند. در نتیجه تغذیه ماهیان با این نوع کربوهیدرات‌ها می‌تواند باعث افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده و به خصوص بیفیدوباکترها و باکتری‌های اسید لاکتیک گردد. همچنین به علت کاهش pH روده به دلیل وجود شرایط تخمیری و تولید اسید توسط جمعیت باکتری‌های مفید، از فعالیت باکتری‌های مضر و بیماری‌زا در دستگاه گوارشی جلوگیری شده و از طرفی جذب مواد معدنی افزایش می‌یابد (Merrifield and Ringo, 2014) که با توجه به مقادیر افزایشی سطح آلبومین در تیمارهای آزمایشی که در ارتباط با جذب عنصر فسفر است این فرضیه می‌تواند تایید شود.

در خصوص ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهیان مورد آزمایش، مقدار پروتئین و چربی تحت تاثیر استفاده از پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید به ترتیب افزایش و کاهش یافت. در این خصوص Aftabgard et al. (۲۰۲۰) بیان کردند استفاده از پری بیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید به همراه پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی آزاد

محلول موکوس تحت تأثیر محرکهای ایمنی از جمله محرک ایمنی گالاتکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) (Kolangi Miandare et al., 2016)، مخمر ساکارومیسیس سروریه (Sheikhzadeh et al., 2012a) و همچنین محرک ایمنی ارگوسان (Sheikhzadeh et al., 2012b) در ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

همچنین افزایش فعالیت لیزوزیم در موکوس ماهی، سرم و بافتهای سرشار از لوکوسیت گزارش شده است (Ellis, 1999). این آنزیم، یک آنزیم ضدباکتریایی بوده که پیوندهای پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتریها را شکسته و در حالت کلی مولکول دفاعی مهم در سیستم ایمنی ذاتی ماهی به شمار می‌رود (Choi et al., 2008). نتایج به دست آمده حاکی از این موضوع بود که میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم به صورت مطلوبی افزایش یافته و بیشترین سطح مربوط به بچه ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم در کیلوگرم ایزوماتوالیگوساکارید می‌باشد. از طرفی نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مشابه با نتایج به دست آمده سایر محققین در خصوص افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم موجود در موکوس ماهیان تحت تأثیر محرکهای ایمنی پری-بیوتیکی بود (Guardiola et al., 2015; Subramanian et al., 2007).

در تحقیقی در ارتباط با تأثیر سایر محرکهای ایمنی پری-بیوتیکی همانند گالاتکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز نشان داده شد که فعالیت لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با گالاتکتوالیگوساکارید افزایش می‌یابد (Kolangi Miandare et al., 2016). همچنین et al. Chang (2013) دریافتند، استفاده از پری بیوتیک مانند بتاگلوکان منجر به افزایش فعالیت لیزوزیم در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) می‌شود و یا اینکه Guzman-Villanueva و همکاران (2014) بیان کردند استفاده از بتاگلوکان در جیره غذایی ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*) باعث افزایش ایمونوگلوبولین می‌شود و یا افزودن محرک ایمنی گالاتکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز، منجر به افزایش معنی‌دار ایمونوگلوبولین نسبت به گروه شاهد شد که با نتایج حاصل از مطالعه کنونی همسو است.

در خصوص علت افزایش شاخصهای ایمنی موکوس در پاسخ به پری بیوتیک خوراکی می‌توان به تغییر فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان توجه کرد که منجر به بهبود وضعیت سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهیان می‌شود (Hoseinifar et al., 2015). همچنین لازم به ذکر است که استفاده از مقدار ۲۰ گرم پری بیوتیک گالاتکتوالیگوساکارید در کیلوگرم جیره غذایی از اثرگذاری کمتری بر

الگوی لیپیدی سرم از طریق اسیدهای چرب کوتاه زنجیره می‌باشد که طی تخمیر توسط پری بیوتیک ها در دستگاه گوارش تولید می‌شوند. بوتیرات از سنتز کلاسترول در کبد جلوگیری می‌کند و منبع خوبی از انرژی، برای سلولهای پوششی روده فراهم می‌کند (Demigne et al., 1995). همچنین پروپونات احتمالاً با کاهش استفاده از اسات به عنوان پیش ساز جهت سنتز کلاسترول، سرعت سنتز کلاسترول در کبد کاهش می‌دهد (Delzenne and Kok, 1999).

علاوه بر این بیان شده است که که مصرف پری بیوتیکها سبب افزایش رشد باکتریهای اسید لاکتیک در دستگاه گوارش میگردند. این میکروارگانیسمها با غیر مزدوج ساختن نمکهای صفراوی، قابلیت جذب آنها را در روده کاهش می‌دهند. در نتیجه بخش زیادی از نمکهای صفراوی به شکل مدفوع از بدن خارج می‌شوند. به دنبال این فرایند با افزایش نیاز تبدیل کلاسترول به اسیدهای صفراوی در کبد از غلظت کلاسترول سرم خون کاسته می‌شود (Ooi and Liong, 2010).

یکی دیگر از مکانیسمهای پیشنهادی، کاهش قابلیت جذب روده‌ای کلاسترول با افزایش ضخامت لایه‌های پوششی جدار روده است. همچنین افزایش بیان ژنی آنزیم ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلوکوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز و افزایش در پروتئینهای عناصر پیوندی کنترل استرول نیز از مکانیسمهای دیگر کاهش کلاسترول توسط پری بیوتیک هاست (Gargari et al., 2013). در خصوص کاهش تری گلیسرید سرم، احتمالاً مکانیسم اصلی کاهش فعالیت‌های لیپونیک در کبد می‌باشد. کاهش بیان ژنی آنزیم های لیپونیک نظیر استیل کوآ کربوکسیلاز، آنزیم مالیک، سترات لیپاز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز و اسید چرب سنتاز، کاتابولیسم لیپوپروتئین های غنی از تری گلیسرید را افزایش می‌دهد (Beylot, 2005). همچنین گلوکز نیز محرک اصلی لیپوناز است و کاهش سطح گلوکز خون می‌تواند لیپوناز را کاهش دهد (Gargari et al., 2013). در خصوص کاهش گلوکز بیان شده است که فیبرهای پری بیوتیکی منجر به بهبود و تعدیل سطح گلوکز خون و کاهش ترشح انسولین به واسطه‌ی داشتن اندیس گلیسمی پایین می‌شوند (Weickert et al., 2006).

از نظر شاخصهای ایمنی موکوس ماهیان میزان پروتئین کل، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل در تیمارهای حاوی پری بیوتیک ایزوماتوالیگوساکارید تا سطح ۱۰ گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری داشت. تنوع در مقدار موکوس ترشح شده بر سطح پوست سبب اختلاف در مقاومت گونه‌ها در برابر پاتوژنها می‌گردد (Subramanian et al., 2007). سلولهای کیسه‌های شکل در موکوس ماهیان، با ترشح پروتئینهایی ماهیان را در برابر عفونتهای ناشی از انگلهای خارجی حفظ می‌کنند. لکتینها، گلیکوپروتئینها از جمله این پروتئینها هستند (Suzuki et al., 2003). افزایش پروتئین

به بالاترین عملکرد از نظر شاخص‌های مربوطه در تیمار ۳، استفاده از ۱۰ گرم پری بیوتیک ایزوماتوالیگوساکارید در کیلوگرم جیره غذایی ماهی تیلایپای قرمز جوان توصیه می‌شود.

### سپاسگزاری

از مسئولین دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به دلیل حمایت از انجام پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### References

Akrami, R., Ghelichi, A. and Gharaei, A. 2010. The use of prebiotics in aquaculture. 2010. *Journal of Fisheries*, 4(1), pp111. (In Persian)

Akrami, R., Iri, Y., Rostami, H.K. and Mansour, M.R., 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hematoimmunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish & shellfish immunology*, 35(4), pp.12351239. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.07.039

Aftabgard, M., Salarzadeh, A., Mohseni, M., Rastravan, M.E., Bahri, A.H., Zorriehzahra, S.J., Najjar Lashgari, S. and Lashtoo Aghaee, G.R., 2020. The synergistic effects of BetaPlus Ultra and prebiotic oligosaccharides on growth performance, hepatosomatic index, hematological parameters, and carcass quality of Caspian trout (*Salmo caspius*). *ISFJ*, 29(5), pp.99110. (In Persian). DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.5.6.2

AOAC. 1995. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edn. AOAC, Arlington. 331337.

Beylot, M., 2005. Effects of inulintype fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *British Journal of Nutrition*, 93 (1), pp. 1638. DOI: 10.1079/bjn20041339

Chang, C.S., Huang, S.L., Chen, S. and Chen, S.N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 35(1), pp.115-125. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.04.004

شاخص‌های زیستی مورد مطالعه در این آزمایش برخوردار بود. در این خصوص بیان شده استفاده از پری بیوتیک‌ها با درجه پلیمرایزیسیون بالا منجر به اثر سو بر باکتری‌های اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای و به تبع آن اثر زیان بار بر میزبان می‌شود ( Hoseinifar and Rufcahei, 2015).

در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اظهار داشت، تحت تاثیر استفاده از جیره‌های غذایی حاوی پری بیوتیک ایزوماتوالیگوساکارید شاخص‌های رشد، تغذیه، ترکیب لاشه، بیوشیمیایی خون و ایمنی موکوس ماهیان تیلایپای قرمز بهبود پیدا کردند که با توجه به دستیابی

Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B., Jang Y.S. and Choe C.H., 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular nonspecific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 24, pp. 6773. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.08.007

Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. and Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Journal International Aquatic Research*, 1(1), pp. 129. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.x

Delzenne, N.M. and Kok, N.N., 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *Journal of Nutrition* 129 (7), pp.146770. DOI: 10.1093/jn/129.7.1467S

Demigne, C., Morand, C., Lévrat, M.A., Besson, C., Moundras, C. and Remesy, C., 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *British Journal of Nutrition* 74(2): 20919. DOI: 10.1079/bjn19950124

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme Assays. In Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, Fair Haven.

ElSayed, A. F., 2019. Tilapia Culture. Academic Press; second edition.

Gargari, B.P., Dehghan, P., Mirtaheri, E. and Aliasgarzadeh, A., 2013. Effects of inulin on lipid profile, inflammation and blood pressure in women with type 2 diabetes: A randomized controlled trial, *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 13 (4), pp. 359370. (In Persian)

Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the

concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), pp14011412. DOI: 10.1093/jn/125.6.1401

Guardiola, F.A., Dioguardi, M., Parisi, M.G., Trapani, M.R., Meseguer, J., Cuesta, A. and Esteban, M.A. 2015. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defenses present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 45 (1), pp.112123. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.02.010

Guerreiro, I., Serra, C.R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. and Enes, P., 2018. Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture Nutrition*, 24(1), pp.153163. DOI:10.1111/anu.12543

Guzman-Villanueva, L.T., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M.A., 2014. Dietary administration of  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish & shellfish immunology*, 39(1), pp.34-41. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.04.024

Haghipoor, M., Sudagar, M., Mazandarani, M. and Hoseinifar, S.H., 2015. The effects of prebiotic isomaltooligosaccharide on some growth factors, survival, and resistance to salinity stress of Common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Journal of Animal Environment*, 7(3), pp. 235240. (In Persian)

Hoseinifar, S.H., Esteban, M.A., Cuesta, A. and Sun, YZ. 2015. Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives, *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 23 (4), pp.315328. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365>

Hoseinifar, S.H. and Rufcahei, R. 2015. Comparative study of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry gut microbiota modulation following administration of galacto and fructooligosaccharide prebiotics, *Biological Journal of Microorganism*, 4(15), pp.135144(In Persian)

Ibrahim, M.T., Samy, H.M., Mahmoud, M.M. and Fathalla, G.M. 2013. Evaluation of Prebiotic (Isomaltooligosaccharide) as a Feed Additive on Growth Performance, Digestibility, and Intestinal Histology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Arabian Journal of Science*, 1(2), pp30.

Ismail, M., Wahdan, A., Yusuf, M.S., Metwally, E. and Mabrok, M., 2019. Effect of dietary supplementation with a synbiotic (Lacto Forte) on growth performance, haematological and histological profiles, the innate immune response and resistance to bacterial disease in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 50(9), pp.25452562. DOI:10.1111/are.14212

Jobling, M., 2012. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp.

Jami, M.J., Kenari, A.A., Paknejad, H. and Mohseni, M., 2019. Effects of dietary  $\beta$ glucan, mannan oligosaccharide, Lactobacillus plantarum and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Fish & shellfish immunology*, 91, pp.202208. DOI:10.1111/are.14212

Kolangi Miandare, H., Farvardin, S., Shabani, A., Hoseinifar, S.H. and Ramezanpour, S.S. 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance, and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 55, pp. 479483. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.06.020

Lee, C.S., Lim, C., Gatlin, D.M. and Webster, C.D. 2015. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health. Wiley-Blackwell.

Lotfan, M., Nazer, A.K., Ebrahimnezhad, Y. and Moghadam, M. 2009. The effects of different sources and levels of prebiotics on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16(1A), pp. 1122. (In Persian)

Merrifield, D.L. and Ringo, E. 2014. Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics, and Prebiotics. WileyBlackwell.

Mokhtari, M., Imanpoor, M.R., Hajimoradloo, A. and Hoseinifar, S.H., 2016. Effects of bacto cell probiotic and galactooligosaccharide prebiotic on the growth, survival, blood parameters, and resistance to salinity stress in treespot gourami (*Trichogaster trichopterus*). *Journal of Animal Environment*, 8(3), pp.199206. (In Persian)

Ooi, L.G. and Liong, M.T. 2010. Cholesterol lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), pp. 24992522. DOI: 10.3390/ijms11062499

- Sabrin Joibari, M., Qobadi, S. and Watan Dost, S. 2017. The effect of different levels of prebiotic AMAX on growth indices, survival and carcass composition in common carp fry (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture development*, 11(1), pp 6375. DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.1.3.0
- Safari, R., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H. and Dadar, M. 2017. The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant, and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 66, pp. 264269. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.05.007
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P. and Lawrence, R., 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment international*, 34(8), pp.12151226. DOI:10.1016/j.envint.2008.04.009
- Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Ahrab Farshbafi, M. and Akbari, M. 2012a. Hilyses, Fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin nonspecific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 32(6), pp.407410. DOI:10.1016/j.fsi.2012.03.00
- Sheikhzadeh, N., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Heidarieh, M. and TayefiNasrabadi, H. 2012b. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 32 (3), pp.407410. DOI:10.1016/j.fsi.2011.11.028
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods* Olsztyn, Poland. pp.10512.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L. and Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148(3), pp.256263. DOI:10.1016/j.cbpb.2007.06.003
- Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M. and Suetake, H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136 (4), pp.723730. DOI: 10.1016/s1096-4959(03)00178-7
- Torrecillas, S., Caballero, M.J., Montero, D., Sweetman, J. and Izquierdo, M., 2016. Combined effects of dietary mannan oligosaccharides and total fish oil substitution by soybean oil on E uropean sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. *Aquaculture Nutrition*, 22(5), pp.10791090. DOI:10.1111/anu.12322
- Weickert, M.O., Mohlig, M.A.T.T.H.I.A.S., Schofl, C., Arafat, A.M., Otto, B., Viehoff, H., Koebnick, C., Kohl, A., Spranger, J. and Pfeiffer, A.F., 2006. Cereal fiber improves wholebody insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes care*, 29(4), pp.775780. DOI: 10.2337/diacare.29.04.06.dc05-2374
- Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhana, W. and Ai, Q. 2010. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio Alginolyticus* in shrimp, *Penaeus Japonicas* (Decapoda: *Penaeidae*). *Aquaculture research*, 42(7), pp. 943952. DOI:10.1111/j.1365-2109.2010.02677.x
- Zhou, Q.C., Buentello, J.A. and Gatlin III, D.M., 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309(14), pp.253257. DOI:10.1016/j.aquaculture.2010.09.003.